

4000006637



AMPLIFIKASI TINDAKBALAS BERANTAI POLIMERASE (PCR) BAGI
MIKROORGANISMA DARI TANAH PAYA BAKAU, KINGFISHER

YEOH LAY CHIN

DISERTASI YANG DIKEMUKAKAN UNTUK MEMENUHI SEBAHAGIAN
DARIPADA SYARAT MEMPEROLEHI IJAZAH SARJANA MUDA SAINS
DENGAN KEPUJIAN

PROGRAM BIOTEKNOLOGI
SEKOLAH SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

PERPUSTAKAAN
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

FEBRUARI 2005

PERPUSTAKAAN UMS



1400006637



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

BORANG PENGESAHAN STATUS TESIS@

JUDUL: AMPLIFIKASI TINDAK BALAS BERANTAI POLIMERASE
(PCR) BAGI MIKROORGANISMA DARI TANAH PAYA BAKAU, KINGFISHER

Ijazah: SARJANA MUDA SAINS

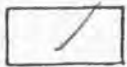
SESI PENGAJIAN: 2004/2005

Saya YEON LAY CHIN

(HURUF BESAR)

mengaku membenarkan tesis (~~LPS~~ Sarjana/Doktor Falsafah)* ini disimpan di Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dengan syarat-syarat kegunaan seperti berikut:

1. Tesis adalah hakmilik Universiti Malaysia Sabah.
2. Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dibenarkan membuat salinan untuk tujuan pengajian sahaja.
3. Perpustakaan dibenarkan membuat salinan tesis ini sebagai bahan pertukaran antara institusi pengajian tinggi.
4. **Sila tandakan (/)



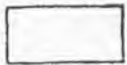
SULIT

(Mengandungi maklumat yang berdarjah keselamatan atau kepentingan Malaysia seperti yang termaktub di dalam AKTA RAHSIA RASMI 1972)



TERHAD

(Mengandungi maklumat TERHAD yang telah ditentukan oleh organisasi/badan di mana penyelidikan dijalankan)



TIDAK TERHAD

Disahkan oleh

Yeon Lay Chin
 (TANDATANGAN PENULIS)

(TANDATANGAN PUSTAKAWAN)

Alamat Tetap: 1062-13-03, TAMAN
HILJAU, JLN PAYA TERUBONG,
11060 PULAU PINANG

MISS TEON PEIK LIN

Nama Penyalia

Tarikh: 26/3/2005

Tarikh: _____

CATATAN: * Potong yang tidak berkenaan.

** Jika tesis ini SULIT atau TERHAD, sila lampirkan surat daripada pihak berkuasa/organisasi berkenaan dengan menyatakan sekali sebab dan tempoh tesis ini perlu dikelaskan sebagai SULIT dan TERHAD.

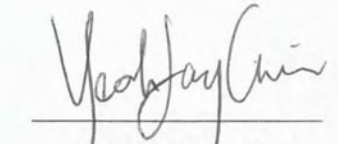
@ Tesis dimaksudkan sebagai tesis bagi Ijazah Doktor Falsafah dan Sarjana secara penyelidikan, atau disertasi bagi pengajian secara kerja kursus dan penyelidikan, atau Laporan Projek Sarjana Muda (LPSM).



PENGAKUAN

Saya akui karya ini adalah hasil kerja saya sendiri kecuali nukilan dan ringkasan yang setiap satunya telah saya jelaskan sumbernya.

21 FEBRUARI 2005



YEOH LAY CHIN
HS2002-3144

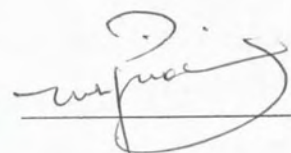


DIPERAKUKAN OLEH

Tandatangan

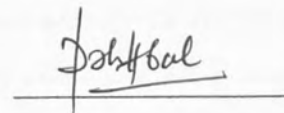
1. PENYELIA

(CIK TEOH PEIK LIN)



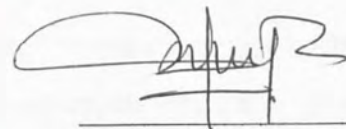
2. PEMERIKSA 1

(DR. ROZIAH HJ. KAMBOL)



3. PEMERIKSA 2

(DR. VIJAY KUMAR)



4. DEKAN

(PROF. MADYA DR. AMRAN AHMED)



PENGHARGAAN

Dalam penghasilan tesis ini, saya ingin mengambil kesempatan ini untuk merakamkan setinggi-tinggi penghargaan kepada Cik Teoh Peik Lin selaku penyelia saya yang telah banyak meluangkan masa memberikan tunjuk ajar, bimbingan dan nasihat sepanjang penyelidikan ini. Jasa baik beliau tidak akan saya lupakan.

Juga tidak ketinggalan ingin saya ucapkan terima kasih kepada Dr. Vijay Kumar dan Dr. Roziah Kambol yang sanggup memberikan pertolongan dan tunjuk ajar semasa saya menjalankan kajian dan analisis-analisis. Kerjasama mereka amat saya hargai.

Terima kasih juga kepada semua rakan seperjuangan, rakan-rakan dan individu-individu lain atas galakan dan pertolongan yang dihukurkan sama ada secara langsung kepada saya dari mula hinggalah akhir penyelidikan. Tanpa bantuan mereka, adalah mustahil buat diri saya untuk menyiapkan tesis ini.

Akhir sekali, saya ingin mengambil kesempatan ini untuk merakamkan rasa terima kasih yang tidak terhingga atas bimbingan, dorongan dan sokongan ibu bapa yang diberikan selama ini kepada saya.



ABSTRAK

Objektif kajian ini adalah mengkaji komuniti mikroorganisma dengan kaedah tanpa pengkulturan pada dua sampel tanah berbeza yang diambil dari kawasan paya bakau, Kingfisher, menerusi ribosomal DNA. Jumlah DNA dari populasi mikroorganisma telah diasingkan melalui teknik pengekstrakan secara terus, iaitu SDS-proteinase K. Daripada kajian, jumlah kepekatan DNA yang dihasilkan daripada kedua-dua tanah berada dalam lingkungan 3.41×10^4 dan $3.52 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$, dengan nisbah $\text{OD}_{260/230}$ antara 0.99 dan 1.18. Primer-primer yang mensasarkan subunit kecil ribosom dan kawasan 'internal transcribed spacer' digunakan untuk tujuan PCR. Walau bagaimanapun, amplifikasi DNA dari tanah sering dihalang oleh perencat tanah seperti asid humik, asid fulvik, kompaun fenolik dan logam berat. Oleh yang demikian, proses penulenan pada 'column chromatography hydroxyapatite' telah dijalankan untuk menghilangkan perencat tanah. Saiz fragmen yang berjaya diperolehi melalui primer PSU adalah lebih kurang 1000bp; manakala pasanagan primer fD1/rP2 dan 18S69/18S1577 adalah lebih kurang 1500bp. Primer FITS amplifikasi fragmen yang pendek kira-kira 300-500bp. Diversiti tanah liat menunjukkan bahawa *Pseudomonas*, fungi serta organisma eukariot yang hadir, manakala tanah pasir hanya menunjukkan kehadiran organisma eukariot.



PCR AMPLIFICATION SOIL MICROBE IN KINGFISHER MANGROVE AREA

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the presence of microbial communities by culture-independent method in two different soil samples collected from mangrove area (Kingfisher) by ribosomal DNA. The total DNA of microbial populations and isolates from a community was extracted by SDS-proteinase K direct lysis technique. DNA yields from the two soil samples were $3.41 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$ and $3.52 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$ respectively, with an $\text{OD}_{260/230}$ purity ratio between 0.99 and 1.18. These DNA were then amplified through polymerase chain reaction (PCR). Primer targeted small subunit rDNA and intergenic spacer region were used for PCR. However, amplification of DNA from soil is often inhibited by co-purified contaminants such as humic acid, fulvic acid, heavy metal and phenolic compound. Therefore, purification on column chromatography hydroxyapatite was carried out for eliminating soil-based inhibitors. The estimated molecular size of the amplified fragment for primer pair PSU was 1000bp; whereas primer pairs fD1/rP2 and 18S69/18S1577 were around 1,500 bp. Primer pairs FITS amplified shorter fragment sizes of around 300-500bp. Loamy soil showed different diversity of bacterial which included *Pseudomonas*, fungus and some eukaryotic organism; however sandy soil indicated only presence of eukaryotic organism.



KANDUNGAN

	MUKA SURAT
PENGAKUAN	ii
PENGESAHAN	iii
PENGHARGAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
SENARAI KANDUNGAN	vii
SENARAI JADUAL	x
SENARAI RAJAH	xi
SENARAI SINGKATAN	xii
SENARAI UNIT	xiii
 BAB 1 PENDAHULUAN	 1
1.1 PENGENALAN	1
1.2 OBJEKTIF KAJIAN	4
 BAB 2 ULASAN PERPUSTAKAAN	 5
2.1 HUTAN PAYA BAKAU	5
2.2 DIVERSITI MIKROORGANISMA TANAH	6
2.2.1 Pengiraan Piring dan Pengiraan Secara Terus	7
2.2.2 Analisis Asid Fosfolipid	9
2.3 PENGEKSTRAKAN NUKLEIK ASID	10
2.3.1 Pengekstrakan DNA Bukan Terus	11
2.3.2 Pengekstrakan DNA Secara Terus	12
2.4 RIBOSOMAL DNA (rDNA)	13
2.4.1 Teknik Penggunaan Gen Ribosomal DNA (rDNA)	15
2.4.2 Kajian Mengenai Ribosomal DNA (rDNA)	16



2.5	APLIKASI TEKNIK PENGGUNAAN RIBOSOMAL DNA (rDNA)	17
2.5.1	Pencapjarian Berak Molekul Rendah DNA (LMW rDNA Fingerprinting)	18
2.5.2	'Denaturing Gradient Gel Electrophoresis' (DGGE) dan 'Temperature Gradient Gel Electrophoresis' (TGGE)	19
2.5.3	'Single stranded Conformation Polymorphism' (SSCP)	20
2.5.4	'Random Amplified polymorphic DNA' (RAPD)	21
2.5.5	'Bisbenzimidide Polyethyleneglycol' (Bb-PEG) Electroforesis	22
2.5.6	'Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis' (ARDRA)	23
2.5.7	'Terminal Restriction Fragment length Polymorphism' (T-RFLP)	23
BAB 3	BAHAN DAN KAEDAH	25
3.1	PENGAMBILAN SAMPEL TANAH	25
3.1.1	Bahan	25
3.1.2	Kaedah	25
3.1.3	Pengukuran pH Sampel Tanah	26
3.2	PENGEKSTRAKAN DNA DARIPADA TANAH	26
3.2.1	Bahan	26
3.2.2	Pengekstrakan DNA Berdasarkan Larutan SDS	26
3.2.3	Pemecahan Enzim	27
3.2.4	Pengekstrakan Kloroform/ Isoamil	27
3.3	TINDAKBALAS POLIMERASE BERANTAI (PCR)	28
3.4	GEL ELEKTROFORESIS	29
BAB 4	KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN	31
4.1	PENGUMPULAN SAMPEL TANAH	31
4.2	PENGEKSTRAKAN DNA DARI SAMPEL TANAH	33
4.3	PENULENAN DNA DARI SAMPEL TANAH	39



4.4 TINDAK BALAS POLIMERASE BERANTAI (PCR)	41
4.4.1 Pengoptimuman mangesium klorida	43
4.4.2 Pengoptimuman 'deoxynucleoside triphosphates' (dNTP)	43
4.4.3 Pengoptimuman kepekatan primer	43
4.4.4 Pengoptimuman suhu pengikat primer	44
4.5 DIVERSITI KOMUNITI DNA DARI TANAH PAYA BAKAU	45
 BAB 5 KESIMPULAN	 56
RUJUKAN	58
LAMPIRAN	



SENARAI JADUAL

No. Jadual	MUKA SURAT
3.1 Jenis-jenis primer yang digunakan	28
4.1 Nilai pH sampel tanah di kawasan persampelan	32
4.2 Nisbah DNA daripada dua jenis sampel tanah	38
4.3 Pengoptimuman PCR parameter	42
4.4 Kombinasi sebelum dan selepas penulenan serta siri pencairan untuk diamplifikasi DNA yang diekstrak	46
4.5 Ringkasan jenis primer yang digunakan dalam kajian serta jangkaan produk PCR yang diperoleh	54



SENARAI RAJAH

No. Rajah	MUKA SURAT
4.1 Kawasan persampelan tanah	31
4.2 Pengekstrakan jumlah komuniti DNA tanah dengan SDS-Proteinase K	34
4.3 Penulenan DNA dengan 'Chromatography Column Hydroxyapatite'	39
4.4 Kesan PCR sebelum pencairan dengan primer universal, fD1 dan rP2	44
4.5 Hasil PCR setelah pencairan bagi primer universal fD1, rP2	47
4.6 Produk PCR dengan primer PSU (56°C), FITS (48°C) dan EITS (55°C)	49
4.7 Hasil PCR dengan primer 18S69F dan 18 S 1577R	52



SENARAI SINGKATAN

A	Adenina (bes dalam jujukan nukleotida DNA)
bp	Pasangan bes
C	Sitosin (bes dalam jujukan nukleotida DNA)
DNA	Asid deoksiribonukleik
EDTA	Asid ethylenediamine Tetra Asetik
G	Guanina (bes dalam jujukan nukleotida DNA)
HCl	Asid hidroklorik
MgCl ₂	Magnesium klorida
NaCl	Natrium klorida
PCR	Tindakbalas berantai polimerase
RAPD	Amplifikasi rawak DNA polimorfik
rDNA	Ribosomal DNA
SSU	Subunit kecil ribosomal
SDS	Sodium dodesil sulfat
TBE	Tris-base, asid borik, Na ₂ EDTA (larutan penimbal)
Tris	Tris(hidrosimetritil) aminometana

SENARAI UNIT

%	Peratus
°C	Darjah Celcius
cm	Sentimeter
g	Gram
L	Liter
mL	Mililiter
μL	Mikroliter
V	Voltan



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 PENGENALAN

Komuniti mikroorganisma yang wujud dalam tanah adalah sangat menakjubkan. Mengikut jangkaan, Vigdis Torsvik (1987) bahawa terdapat sebanyak 10,000 spesies yang berlainan dalam 100g tanah. Daripada itu, sebanyak 10^{11} individu bakteria telah didapati dalam 100g tanah. Tanah sememangnya satu persekitaran yang kompleks, di mana ia terdiri daripada pelbagai 'mikro-niches' yang tidak terhingga hidup dalam keadaan parameter berbeza seperti fizikal, akues dan gas.

Pemahaman terhadap diversiti mikroorganisma seiringan dengan komposisi spesies daripada komuniti tanah sering terhalang berikutan masalah dalam mengelaskan mikroorganisma. Mikroorganisma adalah seni secara keseluruhan dan tidak mempunyai bentuk luaran yang ketara untuk mengelaskan mengikut morfologi. Tambahan pula, pengelasan berdasarkan ciri-ciri fisiologi dan biokimia tidak dapat dilakukan disebabkan sebanyak 99% mikroorganisma dalam persekitaran tidak dapat diasingkan. Untuk



memperoleh pengetahuan yang lanjut tentang peranan diversiti mikroorganisma, penggunaan teknik molekular adalah amat diperlukan.

Teknik molekular yang dipelopori oleh Woese *et al.* (1987) menunjukkan bahawa semua organisma dalam dunia dapat dikelaskan melalui perbandingan analisis jujukan subunit kecil ribosomal RNA (SSU rRNA). Perbandingan analisis subunit kecil rDNA (16S atau 18S rDNA) dan jujukan lain menunjukkan bahawa kehidupan dunia dapat dikategorikan dalam tiga domain yang utama, iaitu, bakteria, eukarya dan arkaea (Madigan *et al.*, 2002). Pokok filogenetik yang berdasarkan rRNA menunjukkan bahawa biodiversiti dunia yang utama adalah mikroorganisma.

Pace *et al.* (1997) telah menyedari bahawa rangka filogenetik pada jujukan rDNA boleh diguna untuk mereka primer dan probe. Penggunaan teknik molekular ini membolehkan kerja mengesan dan pengelasan mikroorganisma dalam habitat semulajadi dapat dijalankan. Ini kemudiannya dapat menentukan struktur, fungsi dan dinamik pada komuniti bakteria (Muyzer & Smalla, 1998).

DNA ribosom (rDNA) yang mengekodkan struktur RNA telah diguna dalam analisis genome. Gen rDNA ini adalah penting dalam mengenalpasti organisma prokariot dan eukariot dengan menggunakan kaedah pembezaan terus jujukan asid nukleik organisma tersebut pada 16-18S rDNA. Hal ini demikian kerana gen rDNA terdapat hampir pada semua spesies organisma, di mana sebahagian besar spesies telah dikenalpasti menerusi gen ini. Selain itu, kawasan 'Internal Transcribed Spacer' (ITS)

pada rDNA juga digunakan dalam pengenalpastian mikroorganisma. Kawasan ITS membenarkan pembezaan ke atas spesies yang berkait rapat (Bruns *et al.*, 1993). Misalnya, 'Internal Transcribed Spacer' telah berjaya menghasilkan primer spesifik yang membezakan spesies fungi yang berkait rapat (Bryan *et al.*, 1995).

Kepentingan penggunaan rDNA dapat dilihat dari pelbagai aspek. Antaranya, pengklonan 16S rDNA yang telah diamplifikasi oleh PCR adalah pendekatan yang paling berjaya dalam menerokai diversiti mikroorganisma, di samping menentukan komposisi spesies dari campuran komuniti mikroorganisma. Kerja pengenalpastian ke atas populasi mikroorganisma turut dijalankan untuk mengkaji fungsi mikroorganisma dalam tanah. Populasi bakteria dari seluruh dunia telah dikatakan berasal dari nich yang sama dengan penggunaan teknik 16S rDNA (Felske *et al.*, 1997). Kajian ini menunjukkan kehadiran konsortia baru yang tidak boleh dikultur menerusi teknik pengkulturan (Head *et al.*, 1998). Selain itu, analisis subunit kecil ribosomal DNA dapat mengatasi perubahan yang timbul dari komuniti mikroorganisma pada peringkat genetik. Ini dapat dilihat dalam penentuan kewujudan bebas nich-mikroorganisma dan interaksi sesama mikroorganisma itu (Lee *et al.*, 1996).

Di samping itu, pencapjarian genetik juga diguna dalam kajian diversiti mikroorganisma. Teknik pencapjarian genetik merupakan bentuk ataupun profil komuniti yang berasaskan pemisahan fizikal terhadap nukleik asid spesies tertentu (Stahl dan Capman, 1994). Kaedah ini adalah cepat dan mudah dilakukan. Kaedah ini juga penting kerana berupaya menganalisis banyak sampel secara serentak. Ini kemudian



membolehkannya diguna untuk membanding diversiti genetik pada komuniti mikroorganisma dari pelbagai habitat.

Dalam kajian ini, teknik menganalisis jumlah komuniti DNA dalam persekitaran tanah paya bakau telah diguna seperti yang dinyatakan oleh Vigdis Torsvik (1987). Analisis ke atas komuniti mikroorganisma adalah kaedah tanpa pengkulturan. Jumlah DNA daripada populasi mikroorganism diasing dengan kaedah pengekstrakan terus. Seterusnya, 5 primer yang mensasarkan kawasan DNA ribosom dalam prokariot dan eukariot digunakan untuk tujuan tindakbalas polimerase berantai. Sebagai tambahan, diversiti komuniti tersebut boleh dicari melalui pendekatan pengklonan berserta jujukan nukleotida pada klon yang dipilih secara random.

1.1 Objektif Kajian

Objektif kajian ini adalah mengkaji diversiti mikrob tanah yang diambil daripada hutan paya bakau melalui amplifikasi kawasan DNA ribosom dengan tindakbalas berantai polimerase.



BAB 2

ULASAN PERPUSTAKAAN

2.1 HUTAN PAYA BAKAU

Hutan paya bakau biasanya terdapat di delta sungai atau berdekatan sungai di sebelah hulu. Perkataan 'mangrove' adalah merujuk kepada paya bakau. Perkataan ini berasal dari kombinasi 'manggi-manggi' dalam bahasa Melayu, yang merujuk kepada pokok *Avicennia*, dan perkataan Arabic 'el gurm', sebagai 'mang-gurm' (Harbison, 1986).

Hutan paya bakau dibentuk akibat daripada pemendapan sungai. Batu-bata yang terlindung daripada pukulan ombak dan angin membenarkan pemendapan berlaku sepanjang proses pembentukan hutan paya bakau. *Rhizophora*, *Sonneratia* dan *Avicennia* adalah spesies tumbuhan paling kerap dijumpai dalam hutan paya bakau. Ekosistem paya bakau mengandungi komponen abiotik dan biotik (Chandwick *et al.*, 1990). Tanah paya bakau terdiri daripada pasir, kelodak dan lanar dalam kombinasi yang berbeza. Tanah lumpur dirujuk sebagai campuran pasir dan kelodak yang kaya dengan bahan organik (Field, 1995). Bahagian permukaan atas tanah paya bakau yang berwarna kuning adalah porus dan mempunyai kebolehan menapis udara dan air ketika air-surut, berbanding



dengan tanah kelodak yang berwarna hitam. Tanah di bawah permukaan paya bakau pula dilitupi oleh air. Pereputan bahan organik berlaku pada kadar yang rendah. Di samping itu, pengudaraan di dalam tanah semakin kurang berikutan pertambahan kedalaman (Hellier, 1998). Tanah yang berwarna kelabu-hitam serta berbau menunjukkan kehadiran hidrogen sulfat akibat daripada aktiviti anaerobik bakteria penurun sulfat, misalnya *Desulfotomaculum* sp (Green, 1998).

Kemasinan air di hutan paya bakau berbeza dan bergantung kepada keadaan air pasang-surut. Tanah paya bakau adalah neutral terhadap sedikit asid disebabkan bakteria penurun sulfat dan kehadiran kelodak yang berasid. Diversiti mikrob dalam tanah hutan paya bakau adalah pelbagai dan bergantung kepada keadaan air pasang dan surut. Antara bakteria yang kerap dijumpai dalam kawasan paya termasuklah *Actinomycetes* dan bakteria methanogenik (Madigan *et al.*, 2002).

2.2 DIVERSITI MIKROORGANISMA TANAH

Diversiti mikroorganisma dalam tanah paya bakau adalah sangat kompleks seperti diversiti mikroorganisma dalam tanah. Diversiti mikroorganisma tanah terdiri daripada sejumlah besar organisma mikroskopik iaitu bakteria, fungi, alga dan protozoa. Spesies fungi mempunyai sebanyak 1.5 ratus juta tetapi hanya lima peratus yang diketahui. Spesies bakteria pula mempunyai seratus juta, tetapi yang diketahui hanya kira-kira lima ribu sahaja pada abad yang lepas (Smalla *et al.*, 1993). Diversiti mikroorganisma tanah sukar dicirikan berikutan diversiti fenotik dan genetik yang melampau. Mengikut



jangkaan, diversiti genetik mikroorganisma tanah berasaskan eksperimen DNA 'renaturation' menunjukkan bahawa terdapat 4×10^3 sehingga 7×10^3 gen yang berlainan dalam satu gram tanah (Selenska & Klingmuller, 1991). Pengekstrapolasi data ini pada diversiti spesies pula menunjukkan bahawa terdapat kira-kira 10^3 ataupun lebih jenis spesies yang menduduki dalam tanah (Selenska & Klingmuller, 1991).

Torsvik telah menggunakan kaedah penggabungan semula kinetik DNA untuk menganggar lebih daripada 10,000 spesies bakteria dalam satu gram tanah (Torsvik *et al.*, 1990). Pada mulanya, kaedah penggabungan semula kinetik DNA dibangunkan untuk menilai gen mamalia yang kompleks. Kaedah ini kemudiannya digunakan secara luas bagi menentukan gen bakteria (Gills *et al.*, 1992). Pendekatan ini berdasarkan anggapan bahawa DNA denaturasi yang kompleks akan menggabung semula pada kadar lebih rendah berbanding dengan jenis DNA denaturasi yang kurang kompleks; manakala kinetik penggabungan adalah berkadar terus kepada kekompleksan struktur gen. Teknik ini tidak sesuai dalam menganalisis diversiti bakteria tanah kerana kurang sensitif dalam menilai perubahan diversiti. Namun begitu, teknik ini memberi laluan kepada pembangunan kaedah pengiraan seperti pengiraan piring atau 'most probable number' (MPN) (Johnsen *et al.*, 2001).

2.2.1 Pengiraan Piring dan Pengiraan Secara Terus

Dalam kaedah pengiraan piring ini, organisma spesifik dari taksonomi atau kumpulan berfungsi tertentu dikultur dalam media agar. Koloni ini kemudian diasingkan dari media

untuk dikenalpasti (Vandamme *et al.*, 1996). Dalam menilai diversiti mikroorganisma yang boleh dikultur, koloni berkenaan pada medium diplot melawan masa inkubasi. Pengiraan piring hanya dapat menganggar 1-10% daripada jumlah mikroflora tanah (Bakken, 1997). Perbezaan ini berlaku berikutan terdapat ketidaksamaan tahap pergantungan antara organisma berlainan, ketidakupayaan untuk menghasil kultur tulen seperti keadaan persekitaran sebenar yang dihadapi oleh mikroorganisma dalam tanah. Tambahan pula, sesetengah spesies mikrob hanya boleh dikultur bawah keadaan fizikal tertentu (Muyzer & Smalla, 1998).

Pengiraan secara terus dengan mikroskop pendarfluor berupaya memberi bilangan 100-1000 kali lebih banyak daripada pengiraan piring. Beberapa cara untuk menanda protein dan asid nukleik untuk bakteria juga digunakan. Antaranya termasuklah 'fluorescein isothiocyanate' (FITC), 'acridine orange' (AO), 'ethidium bromide' (EB) dan 'differential fluorescent stain' (DFS) (Johnsen *et al.*, 2001). Kaedah penanda untuk bakteria sel yang aktif termasuklah 'fluorescent diacetate' (FDA) atau 'probe redox'. Cara memperbaiki pengiraan secara terus dilakukan dengan video kamera pada mikroskop epifluorescent (Bloem *et al.*, 1995). Walaupun begitu, langkah ini tidak dapat mengira spesies mikroorganisma dengan spesifik disebabkan penanda yang diguna tidak dapat membezakan mikroorganismal sel hidup dan mati.

Selain itu, terdapat kaedah lain yang turut diguna dalam membandingkan komuniti tanah. Antaranya termasuklah penghibridan DNA secara silang. Penghibridan DNA secara silang telah diguna untuk membandingkan komuniti tanah terutamanya



persamaan antara dua jenis bakteria (Stackebrandt & Goebel, 1994). Kaedah ini tidak sensitif dan menjadinya sukar diguna secara kuantitatif bagi menentukan komuniti yang mempunyai struktur hampir sama.

2.2.2 Analisis Asid Fosfolipid

Pendekatan analisis asid fosfolipid dapat mengatasi masalah yang timbul daripada pemilihan pengkulturan dalam menilai komposisi mikroflora tanah (Pankhurst *et al.*, 2001). Teknik ini berdasarkan pengekstrakan, pemecahan, pengmetilan dan kromatografi komponen fosfolipid pada lipid tanah. Fosfolipid adalah berkaitan dengan komponen mikroflora tanah kerana fosfolipid merupakan komponen penting bagi sel membran yang hidup. Fosfolipid ini akan dipecah dengan cepat apabila sel mati, dan tidak boleh tahan lama untuk berinteraksi dengan koloid tanah (Zelles, 1999).

Tambahan pula, fosfolipid adalah biopenanda yang penting; fosfolipid membentuk sebahagian daripada berat organisma. Perubahan pada fosfolipid profil berkaitan dengan variasi terdapat pada kumpulan mikrobial. Perubahan ini dapat diterjemah dengan merujuk kepada pangkalan data kultur tulen dan urutan biosintetik yang diketahui (Zelles, 1999). Pengekstrakan terus melalui kaedah analisis asid fosfolipid ataupun kesemua asid lemak dari tanah tidak membolehkan kerja pengesanan dilakukan pada peringkat spesies. Kaedah ini hanya dapat diguna untuk menganggar perubahan pada struktur komuniti secara kasar (Tunlid & White, 1992).

Walaupun bagaimanapun, pengenalpastian spesies melalui analisis asid lemak boleh dijalankan bersama media kultur yang piawai dan pangkalan data. Banyak asid lemak telah diasingkan daripada kumpulan spesifik mikroorganisma. Berat bakteria dapat dikira dengan membuat ringkasan terhadap beberapa asid lemak, misalnya berat fungi diperoleh dari asid lemak dalam nisbah 18:2ω6c (Frostegard & Baath, 1996).

Walaupun kaedah pengkulturan telah lama diguna dalam mengkaji diversiti mikroorganisma dalam tanah, namun kaedah ini tidak sesuai digunakan atas sebab kurang daripada 1% mikroorganisma tanah yang boleh dikultur (Olsen *et al.*, 1990). Kebanyakan spesies yang dapat dikultur dari pengekstrakan sampel DNA dari persekitaran merupakan spesies yang kurang penting dalam komuniti alam semula jadi. Tambahan pula, mikroorganisma merupakan organisma kecil dan sukar dikelaskan. Kelemahan kaedah pengkulturan disebabkan ketidaksesuaian keadaan pengkulturan. Lantaran itu, hanya prokariot jenis cepat-tumbuh dapat dikultur dalam media (Nubel *et al.*, 1996). Oleh itu, kaedah ini tidak dapat diguna untuk menganalisis komuniti tanah, lebih-lebih lagi populasi tanah mempunyai populasi bakteria yang tinggi daripada habitat lain (Olsen *et al.*, 1990). Maka, kaedah yang lebih canggih seperti analisis terhadap ribosomal DNA (rDNA) diperkenalkan.

2.3 PENGEKSTRAKAN ASID NUKLEIK

Pengekstrakan nukleik asid merupakan langkah amat penting dalam penyiasatan molekular bagi mikroorganisma. Lantaran itu, pelbagai jenis kaedah dibangunkan untuk



RUJUKAN

- Angert, E.R., Clements, K.D. dan Pace, N.R., 1993. The largest bacterium. *Nature* **362**, 239-241.
- Angert, E.R., Northrup, D.E., Resenbach, A.L., Peek, A.S., Goebel, B.M. dan Pace, N.R., 1998. Molecular analysis of a bacterial community in Sulphur River, Parker Cave, Kentucky. *American Mineralogist* **83**, 1583-1592.
- Arnheim, N. dan Erlich, H., 1992. Polymerase chain reaction strategy. *Annual Biochemistry* **61**, 131-156.
- Avaniss-Aghajani, E., Jones, K., Chapman, D. dan Brunk, C., 1994. A molecular technique for identification of bacteria using small subunit ribosomal RNA sequences. *Biological Techniques* **17**, 144-149.
- Bakken, L.R., 1997. Culturable and noncultable bacteria in soil. Dlm: Van Elsas, J.D., Trecors, J.T. dan Wellington, E.M. (pnjt.) *Soil Microbiology*. Marcel Dekker, New York, 47-61.
- Barnes, S.M., Takala, S.L. dan Kuske, C.R., 1999. wide distribution and diversity of members of the bacterial kingdom *Acidobacterium* in the environment. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 1731-1737.
- Berbee, M.L., Carmean, D.A. dan Winka, K., 2000. Ribosomal DNA and resolution of branching order among the ascomycota: how many nucleotides are enough? *Molecular Phylogenetic Evolution* **17**, 337-344.



- Bidle, K.D. dan Flecher, M., 1995. Comparison of free-living and particle-associated bacterial communities in the Chesapeake Bay by stable low-molecular-weight RNA analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 944-952.
- Borneman, J., Skroch, P.W., O'Sullivan, K.M., Paulus, J.A., Rumjanek, N.G., Jansen, J.L., Nienhuis, J. dan Triplett, E.W., 1996. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 1935-1943.
- Breen, A., Rope, A.F., Taylor, D., Loper, J.C., 1995. Application of DNA amplification fingerprinting (DAF) to mixed culture bioreactors. *Journal Industrial Microbiology* **14**, 10-16.
- Bruns, T.D., White, T.J. dan Taylor, J.W., 1993. fungal molecular systematics. *A Review on Ecology System* **22**, 525-564.
- Bryan, G.T., Daniels, M.J. dan Osbourn, A.E., 1995. Comparison of fungi within *Gaeumannomyces-Phialophora* complex by analysis of ribosomal sequence. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 681-689.
- Chandler, D.P., Li, S.M., Spandoni, C.M., Drake, G.R. dan Balkwill, D.L., 1997. a molecular comparison of culturable aerobic heterotrophic bacteria and 16S rDNA clones derived from a deep subsurface sediment. *FEMS Microbiology Ecology* **23**, 131-144.
- Chandwick, D., Oliver, A. dan Larson B.C., 1990. *Forest Stand Dynamics*. McGraw-Hill, New York.



- Conway, D.R., Frankland, J.C., Saunders, V.A., Whalley, A.J.S. dan Evams, E.H. Use of the ribosomal DNA internal transcribed spacer to detect microorganisms in the environment. *Mycological Research* **104**, 187-197.
- Cullen, D.W. dan Hirsch, P.R., 1998. Simple, and rapid method for direct extraction of microbial DNA for soil for PCR. *Soil Biology Biochemistry* **30**, 983-993.
- DeLong, E.f., Wu, K.Y., Prezelin, B.B. dan Jovine, V.M., 1994. High abundance of *Archaea* in antarctic marine picoplankton. *Nature* **317**, 695-697.
- Edward, A.P. dan Bremner, J.M., 1995. Dispersion of mineral colloids in soil using cation-exchanger resin. *Nature* **205**, 208-209.
- Faegri, A., Torsvik, V.L. dan Goksoyr, J., 1992. Bacterial and fungi activities in soil : separation of bacteria and fungi by rapid fractional centrifugation technique. *Soil Biology Biochemistry* **9**, 105-112.
- Felske, A., Wolterink, H., Stackebrandt, E. dan Akkermans, A.D.L., 1997. Ribosome analysis reveals prominent activity of an uncultured member of the class Actinobacteria in grassland soils. *Microbiology* **143**, 2983-2989.
- Field, C.D., 1995. *Journey Amongst Mangroves*. International Society of Mangrove Ecosystems, Okinawa, 140.
- Fujuta, S. dan Hashimoto, T., 2000. DNA fingerprinting patters of *Candida* species using *HinfI* endonuclease. *International Journal System of Evolution Microbiology* **50**, 1381-1389.



- Garcia-Pichel, F., Prufert-Bebout, L. dan Muyzer, G., 1996. Phenotypic and phylogenetic analyses show *Microcoleus chthonoplastes* to be a cosmopolitan cyanobacterium. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 3284-3291.
- Gest, H. 1999., Bacterial classification and taxonomy : a 'primer' for the new millennium. *Microbiology Today* **26**, 70-72.
- Giovannoni, S.J., Britschgi, T.B., moyer, C.L. dan field, K.G., 1990. Genetic diversity in Sargass Sea bacterioplankton. *Nature* **345**, 60-63.
- Gray, J.p. dan Herwig, R.P., 1996. Phylogenetic analysis of the bacterial communities in marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 4049-4059.
- Gorbunoff, M.J., 1984. *Analytical Biochemistry* **136**, 433.
- Hadrys, H., Balick, M. dan Schierwater, B., 1992. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology* **1**, 55-63.
- Harbison, P. 1986. Mangrove Muds - A sink and a source for trace metals. *Marine Pollution Bulletin* **17**, 246-250.
- Head, I.M., Saunders, J.R. dan Pickup, R.W., 1998. Microbial evolution, diversity and ecology : A decade of ribosomal RNA analysis of uncultivate microorganisms. *Mikrobial Ecology* **35**, 1-21.
- Hellier, C., 1998. The mangrove wastelands. *The Ecologist Journal* **18**, 214-217.



- Henry, T., Iwen, P.C. dan Hinrichs, S.H., 2000. Identification of *Aspergillus* spesies using internal transcribed spacer regions 1 and 2. *Journal Clinical of Microbiology* **38**, 1510-1515.
- Hilger, A.B. dan Myrold, D.D., 1991. Method for extraction of *Frankia* DNA from soil. *Agriculture Ecosystems Environmental* **34**, 107-113.
- Höfle, M.G. dan Brettar, I., 1996. Genotyping of heterotrophic bacteria from the central Baltic Sea by use of low-molecular weight RNA profiles. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 1383-1390.
- Höfle, M.G., 1998. Genotyping of bacterial isolates from the environment using low molecular weight RNA fingerprintings. *Molecular Microbiology Ecology Mannual*, 3.3.7, 1-23.
- Holben, W.E., Jansson, J.K., Chelm, B.K. dan Tiedje, J.M. 1998. DNA probe method for the detection of spesific microorganisms in the soil bacterial community. *Applied and Environmental Microbiology* **54**, 703-711.
- Hugenholtz, P., Pitulle, C., Hershberger, K.L. dan Pace, N.R., 1998. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *Journal Bacteriology* **180**, 336-376.
- Hugenholtz, P., Pitulle, C., Hershberger, K.L. dan Pace, N.R., 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal Bacteriology* **180**, 4765-4774.



- Jacobsen, C.S. dan Ramussen, O.F., 1992. Development and application of a new methods to extract bacterial DNA from soil based on separation of bacteria from soil with cation-exchange resin. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 2458-2462.
- Jackson, C.J., Barton, R.C. dan Evans, E.G.V., 1999. Species identification and strain differentiation of dermatophyte fungi by analysis of ribosomal DNA intergenic spacer regions. *Journal Clinical Microbiology* **37**, 931-936.
- Jan Dirk, V. E. dan Kornella, S., 1995. Extraction of microbial community DNA from soil. *Molecular Microbial Ecology Manual* 1.3.3: 1-11.
- Johnsen, K., Jørgensen, C.S., Torsvik, V. dan Sørensen, J., 2001. Pesticides effects on bacterial diversity in agricultural soils : a review. *Biology and Fertility of Soils* **33**, 443-453.
- Kantler, P.M. dan Schwartz, H.S., 1989. *Analytical Biochemistry* **97**, 77.
- Lee, D.H., Zo, Y.G. dan Kim, S.J., 1996. Non-radioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by single-stranded-conformation polymorphism. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 3112-3120.
- Lee, W.T., Marsh, T.L. dan Forney, L.J., 1998. Determination of the microbial diversity of anaerobic-aerobic activated sludge by a novel molecular biological technique. *Wat Science Technology* **37**, 417-422.
- Leff, K.A., Rhemis, H., dan Seufert, S., 1995. Molecular monitoring of an uncultured group of the class Actinobacteria in two terrestrial environments. *Journal Microbiology Methods* **36**, 65-67.



- Liesack, W., Janssen, P.H., Rainey, F.A., Ward-Rainey, N. dan Stackebrandt, E., 1991. Potential risks of gene amplification by PCR as determined by 16S ribosomal DNA analysis of a mixed-culture of strict barophilic bacteria. *Microbiology Ecology* **21**, 191-198.
- Liesack, W. dan Stackebrandt, E., 1992. Occurrence of novel groups of the domain Bacteria as received by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment. *Journal bacteriology* **174**, 5072-5078.
- Linder, C.R., Moore, A.L. dan Jackson, R.B., 2000. A universal molecular method for identifying underground plant parts to species. *Molecular Ecology* **9**, 1549-1559.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., dan Packer, J., 2002. *Brock Biology of Microorganisms*. Ed. Ke-10. Prentice Hall, London.
- Martinez-murcia, A.J., Acinas, S.G. dan Rodriguez-Valera, F., 1995. Evaluation of prokaryotic diversity by restriction digestion of 16S rDNA directly amplified from hypersaline environments. *FEMS Microbiology Ecology* **17**, 247-256.
- Massol, A.A., Olderson, D.A., Hicky, R.F. dan Tiedje, J.M., 1995. Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16S-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). *Microbiology Ecology Manual* 3.3.2, 1-18.
- McNeil, A., Rondon, M., Amsaleg, C., 1993. Efficient recovery of environmental DNA for expression cloning by indirect extraction methods. *FEMS Microbial Ecology* **44**, 153-163.



- McPherson, M.J., Quirke, P. dan Taylor, G.R., 1995. *PCR: A Practical Approach*. Oxford University Press, New York.
- More, M. I., Herrick, J. B., Silva, M.C., Ghiorse, W.C. dan Madsen, E.L., 1994. Quantitative cell lysis of indigenous microorganisma and rapid extraction of microbial DNA from sediment. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 1572-1580.
- Munson, M.A., Nedwell, D.B. dan Embley, T.M., 1997. Phylogenetic diversity of archaea in sediment samples from a coastal salt marsh. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 4729-4733.
- Muyzer, G., DeWaal, E.C. dan Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of poymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 695-700.
- Muyzer, G. dan Smalla, K., 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoeck, International Journal of Genaral and Molecular Microbiology* **73**, 127-141.
- Nishida, H. dan Sugiyama, J., 1993. Phylogenetic relationships among Taphrina, Saitoella dan other higher fungi. *Molecular Biology Evolution* **10**, 431-436.
- Nishida, H., 2001. Distribution of genes for lysine biosynthesis through the aminoadipate pathway among prokaryotic genomes. *Bioinformatics* **17**, 189-191.



- Nubel, U., engelen, B., Felske, A. dan Snaidr, J., 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal Bacteriology* **178**, 5636-5643.
- O'Donnell. K., 1992. Ribosomal DNA internal transcribed spacers are high divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambuc* (*Gibberella pulicaris*). *Current Opinion of Genetic* **22**, 213-220.
- Ogram, A., Sayler, G.S. dan Barkay, T., 1987. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal Microbiological Methods* **7**, 57-66.
- Olsen, G.D., Lane, D.J., Giovannoni, S.J. dan Pace, N.R., 1990. Microbiology ecology and evolution : a ribosomal RNA approach. *Annual Reviews Microbiology* **24**, 337-365.
- Pace, N.R., Gordon, D., Abajian, C. dan Green, P., 1987. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* **276**, 734-740.
- Pankhurst, C.E., Yu, S., Hawke, B.G. dan Harch, B.D., 2001. Capacity of fatty acid profiles and substrate utilization patterns to describe differences in soil microbial communities associated with increased salinity or alkalinity at three locations in south Australia. *Biology and Fertility of Soils* **33**, 204-207.
- Peter, K.L. dan Sivasothi, N., 2001. *A Guide to Mangroves of Singapore*. Raffle Museum of Biodiversity Research, Singapore.
- Philip, H., Christian, P., Karen, L.H. dan Norman, R.P., 1998. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone Hot Spring. *Journal of Bacteriology* **180**, 366-376.



- Pillai, S.D., Josephson, K.L., Bailey, R.L. dan Pepper, I.L., 1992. Specific detection of rhizobia in root nodules and soil using the polymerase chain reaction. *Soil biology Biochemical* **24**, 885-891.
- Porteous, L.A., Armstrong, J.L., Seidler, R.J. dan Watrud, L.S., 1994. An effective method to extract DNA from environmental samples for polymerase chain reaction amplification and DNA fingerprint analysis. *Current Microbiology* **29**, 301-307.
- Rangarajam, S., Saleena, L.M. dan Nair, S., 2002. Diversity of *Pseudomonas* spp. isolated from rice rhizosphere popiulations grown along a salinity gradient. *Plant Pathology* **43**, 112-130.
- Schi-Ichi, F., Yasuko, S., Shieki, N. dan Takuma, H., 2001. Multiplex PCR usisng internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. *Journal of clinical Microbiology* **39**, 3617-3622.
- Selenska, S. dan Klingmuller, W., 1991. DNA recovery and direct detection of Tn5 sequences from soil. *Letter Applied Microbiology* **13**, 21-24.
- Siering, P.L., 1998. The double helix meets the crystal lattice: The power and pitfalls of nucleic acid approaches for biomineralogical investigations. *American Mineralogist* **83**, 1593-1607.
- Smalla, K., Cresswell, N., Mendonca-Hagler, L.C., Wolters, A. dan Van Elass, J.D., 1993. Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction-mediated amplification. *Journal Applied Bacteriology* **74**, 78-85.
- Smit, E., Lee, P.F. dan Wernars, K., 1997. Detection of shifts in microbial community structure and diversity in soil caused by copper contamination using amplified ribosomal DNA restriction analysis. *FEMS Microbiology Ecology* **23**, 249-261.



- Stefan, P., Vazquez, J.A., Boikov, D., Xu, C., Sobel, J.D. dan Akins, R.A., 1997. Identification of candida species by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting of colony lysates. *Journal of Clinical Microbiology* **35**, 2031-2039.
- Steffan, R.J. dan Atlas, R.M., 1998. Recovery DNA from soils and sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **54**, 2908-2915.
- Tomblinson, P.B., 1990. The botany of mangrove. Cambridge University Press, united kingdom, 140 ms.
- Torsvik, V., 1987. Isolation of bacterial DNA from soil. *Soil Biological Biochemistry* **12**, 15-21.
- Torsvik, V., Goksoyr, J. dan Daae, F.L., 1990. High diversity of DNA of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **56**, 782-787.
- Torsvik, V., Salte, K., Sorheim, R. dan Goksoyr, J., 1990. Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **56**, 778-781.
- Trevors, J.T., Lee, H. dan Cook, S., 1992. Direct extraction of DNA from soil. *Microbiology Releases* **1**, 11-115.
- Tsai, Y.L. dan Olson, B.H., 1992. Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 2292-2295.
- Vandamme, P., Pot, B., Gills, M., DeVos, P., Kersters, K. dan Swing, S.J., 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbial Reviews* **60**, 407-438.



- Wadlin, J.K., Hanks, G., Stewart, R., Pape, J. dan Nachamkin, I., 1999. Comparison of three commercial systems for identification of yeasts commonly isolated in the clinical microbiology laboratory. *Journal Clinical Microbiology* **37**, 1967-1970.
- Ward, D., Weller, R. dan Bateson, M.M., 1990. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature* **345**, 63-65.
- Wasay, S.A., Parker, W.J. dan Van Geel, P.J., 2001. Contamination of a calcareous soil by battery industry wastes: II. *Treatment of Canadian Journal of Civil Engineering* **28**, 349-354.
- Watson, R.J. dan Blackwell, B., 2000. Purification and characterization of a common soil component which inhibits the polymerase chain reaction. *Canadian Journal of Microbiology* **46**, 633-642.
- Wawer, C., Rüggeberg, H., Meyer, G., dan Muyzer, G., 1995. A simple and rapid electrophoresis method to detect sequence variation in PCR-amplified DNA fragments. *Nucleic Acids Residues* **23**, 4928-4929.
- White, T.J., Burns, T., Lee, S. dan Taylor, J., 1990. *Amplification and sequencing of fungal ribosomal rRNA genes for phylogenetics*. Academic Press, San diego.
- Wintzingerode, F., Göbel, U.B., dan Stackebrandt, E., 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Review*. **21**, 213-229.
- Woese, R., William, P.A. dan Wheateroft, R., 1987. Rapid Methods for the study of the both stable and unstable plasmids in *Pseudomonas*. *Journal Genes Microbiology* **124**, 433-437.



- Wren, G., 1998. The natural history of insect herbivory on the mangrove tree in and near Singapore. *Ecological Society Newsletter* **88**, 113-203.
- Yeates, C., Gillings, M.R., Davison, A.D., Altavilla, N. dan Veal, D.A., 1997. PCR amplification of crude microbial DNA extracted from soil. *Letters in Applied Microbiology* **25**, 303-307.
- Zhou, J.H., Mary, A.B. dan James, M.T., 1996. DNA recovery from soil of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**, 316-322.

